

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 02-062828

(43)Date of publication of application : 02.03.1990

(51)Int.Cl.

A61K 37/02
C07K 5/08
C07K 5/10
C07K 7/06
C07K 7/08
// A61K 37/16
A61K 37/18
C07K 99:00

(21)Application number : 63-211696

(71)Applicant : AJINOMOTO CO INC

(22)Date of filing : 26.08.1988

(72)Inventor : KOMURA MASANORI
NIO NORIKI
ARIYOSHI YASUO

(54) NOVEL PEPTIDE AND HYPOTENSOR CONTAINING THE PEPTIDE

(57)Abstract:

NEW MATERIAL: 28 Kinds of peptides expressed by formulas I-XIV.

USE: A hypotensor. It has high pharmacological activity, mild action and low side effect.

PREPARATION: The objective peptide can be prepared by condensing (A) a raw material having a reactive carboxyl group and corresponding to one of the two fragments divided at an arbitrary position of peptide bonds and (B) a raw material having a reactive amino group and corresponding to the other fragment by dicyclohexyl-carbodiimide process which is a conventional solid-phase process for peptide synthesis and, as necessary, removing the protecting group from the product. The peptide has been obtained by the investigation of a peptide fragment in human β -casein having known structure.

BEST AVAILABLE COPY

1-4

⑩ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A)

平2-62828

⑬ Int. Cl.⁹

A 61 K 37/02
C 07 K 5/08
5/10
7/06
7/08

識別記号

ABU

ZNA

Z

庁内整理番号

8615-4C
8318-4H
8318-4H
8318-4H
8318-4H※

⑭ 公開 平成2年(1990)3月2日

審査請求 未請求 請求項の数 2 (全9頁)

⑮ 発明の名称 新規ペプチドおよびこれを含有する降圧剤

⑯ 特 願 昭63-211696

⑰ 出 願 昭63(1988)8月26日

⑱ 発 明 者 香 村 正 徳 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社中央
研究所内

⑲ 発 明 者 丹 尾 式 希 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社中央
研究所内

⑳ 発 明 者 有 吉 安 男 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社中央
研究所内

㉑ 出 願 人 味の素株式会社 東京都中央区京橋1丁目5番8号

㉒ 代 理 人 弁理士 石田 康昌
最終頁に続く

明 細 書

1. 発明の名称

新規ペプチドおよびこれを含有する降圧剤

2. 特許請求の範囲

1. 下記構造式のいずれかで示されるペプチド
およびその塩。

以下余白

Asp-Lys-Ile-Tyr-Pro-Ser-Phe-Gln-Pro-Gln-Pro-Leu-Ile-Tyr-Pro
Lys-Ile-Tyr-Pro-Ser-Phe-Gln-Pro-Gln-Pro-Leu-Ile-Tyr-Pro
Ile-Tyr-Pro-Ser-Phe-Gln-Pro-Gln-Pro-Leu-Ile-Tyr-Pro
Tyr-Pro-Ser-Phe-Gln-Pro-Gln-Pro-Leu-Ile-Tyr-Pro
Pro-Ser-Phe-Gln-Pro-Gln-Pro-Leu-Ile-Tyr-Pro
Phe-Val-Gln-Pro-Ile-Pro
Leu-Pro-Gln-Asn-Ile-Leu-Pro
Pro-Ala-Val-Val-Leu-Pro
Pro-Phe-Phe-Asp-Pro-Gln-Ile-Pro
Leu-Thr-Asp-Leu-Gln-Asn-Leu-His-Leu-Pro
Leu-His-Leu-Pro-Leu-Pro
Pro-Leu-Trp-Ser-Val-Pro
Pro-Val-Arg-Ala-Val-Pro
Pro-Gln-Thr-Leu-Ala-Leu-Pro

以下余白

Asp-Lys-Ile-Tyr-Pro-Ser-Phe-Gln-Pro-Gln-Pro-Leu-Ile-Tyr-Pro
 Lys-Ile-Tyr-Pro-Ser-Phe-Gln-Pro-Gln-Pro-Leu-Ile-Tyr-Pro
 Ile-Tyr-Pro-Ser-Phe-Gln-Pro-Gln-Pro-Leu-Ile-Tyr-Pro
 Tyr-Pro-Ser-Phe-Gln-Pro-Gln-Pro-Leu-Ile-Tyr-Pro
 Pro-Ser-Phe-Gln-Pro-Gln-Pro-Leu-Ile-Tyr-Pro
 Phe-Val-Glu-Pro-Ile-Pro
 Leu-Pro-Gln-Asn-Ile-Leu-Pro
 Pro-Ala-Val-Val-Leu-Pro
 Pro-Phe-Phe-Asp-Pro-Gln-Ile-Pro
 Leu-Thr-Asp-Leu-Gln^u-Asn-Leu-His-Leu-Pro
 Leu-His-Leu-Pro-Leu-Pro
 Pro-Leu-Tyr-Ser-Val-Pro
 Pro-Val-Arg-Ala-Val-Pro
 Pro-Gln-Thr-Leu-Ala-Leu-Pro
 Leu-Asn-Pro-Pro-His-Gln-Ile-Tyr-Pro
 Asn-Pro-Pro-His-Gln-Ile-Tyr-Pro
 Pro-Pro-His-Gln-Ile-Tyr-Pro
 Pro-His-Gln-Ile-Tyr-Pro
 Pro-Val-Gln-Ala-Leu-Leu-Gln-Leu-Leu-Asn-Pro
 Leu-His-Leu-Pro
 Leu-Gln-Asn-Leu-His-Leu-Pro-Leu-Pro
 Gln-Asn-Leu-His-Leu-Pro-Leu-Pro
 Asn-Leu-His-Leu-Pro-Leu-Pro
 His-Leu-Pro-Leu-Pro
 Leu-Pro-Leu-Pro
 Pro-Leu-Pro
 Tyr-Pro-Gln-Pro-Leu-Ile-Tyr-Pro
 Tyr-Pro-Leu-Ile-Tyr-Pro

3. 発明の詳細な説明

産業上の利用分野

本発明は、新規ペプチドおよびこれを含む降圧剤に関する。

従来の技術

近年、牛乳カゼイン等の食品蛋白質の酵素分解物中にオピオイドペプチド(1)、Ca吸収促進ペプチド、アンジオテンシン変換酵素阻害ペプチド(2)等、種々の薬理活性ペプチドが存在することが報告されてきた。これは、食品が単に栄養面での直接性を持つだけでなく、外在性の因子として生体の制御に参与している可能性を示していると考えられる、しかしこのようなペプチドの生理的意義は今のところほとんど明らかにされていない。

参考文献

- (1): 1) V.Brantl, H.Teschmacher, A.Henshen, and F.Lottspeich, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 360, 1211 (1979).
2) S.Loukas, D.Varoucha, C.Zioudrou, R.A.Streaty and W.A.Klee, Biochemistry, 22,

4567 (1983).

(2): S.Maruyma, K.Nakagomi, N.Tomisaka, and H.Suzuki, Agric. Biol. Chem., 49 (5), 1405 (1985)

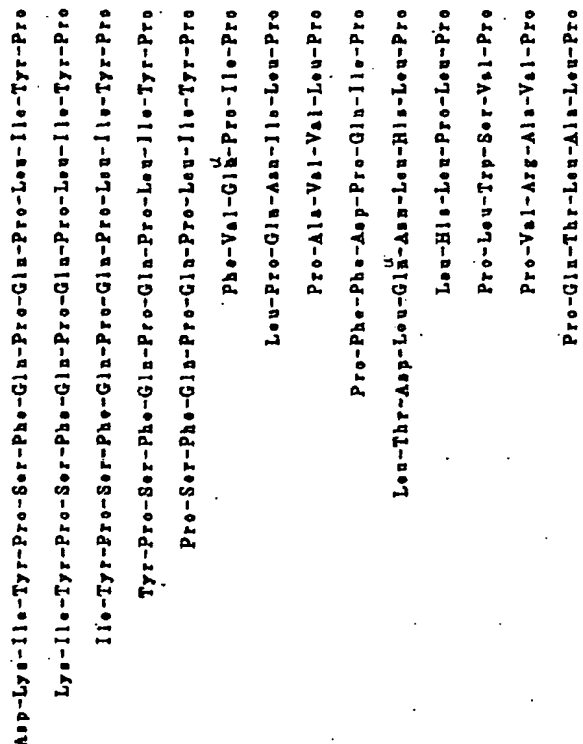
一方、従来の医薬品は、多くの場合副作用等を有し安全性の問題を抱えてきたため、副作用が少なく、安全性の高い薬剤の開発が重要な課題となっている。上記のような食品蛋白質由来のペプチドを、医薬品等として利用する場合、これらの起源が日常我々が摂取する食品であることから、極めて安全性の高いものが得られると考えられる。さらに人間にとっては異種タンパクである牛乳カゼインではなく、人乳カゼインを用い、この中から薬理活性ペプチドを見い出すことにより、より安全性の高いものを得ることが可能である。しかし人乳カゼインを量的に得ることは困難であり、また酵素分解による方法では、用いる酵素の基質特異性や反応条件等により、生じるペプチドが変化して目的ペプチドが得られるとは限らない。

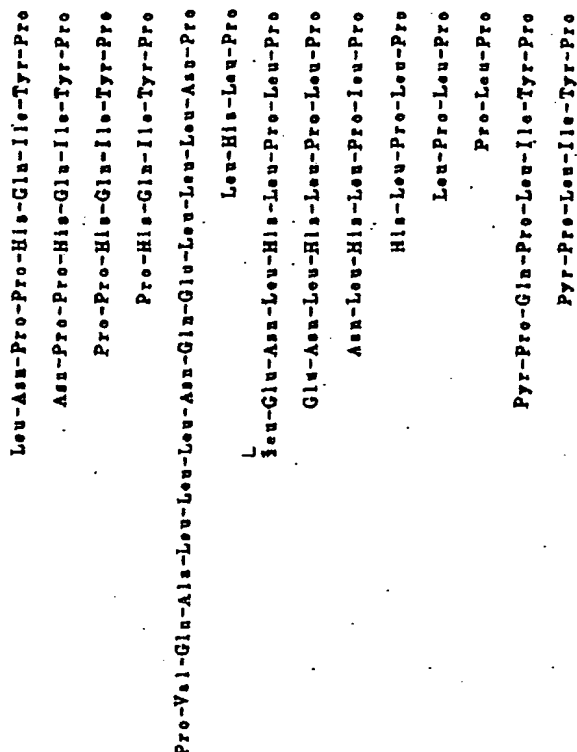
発明が解決しようとする課題

前記薬理活性が高くかつ作用が穏やかで、副作用の少なく医薬に適したものの開発が期待されている。

課題を解決するための手段

前記問題点を解決すべく鋭意検討を重ねた結果本発明者らは構造既知のヒトβ-カゼイン中のペプチドフラグメントを種々検討し、下記ペプチドを新規に合成することに成功し、かつ、降圧剤として優れていることを見出し、本発明を完成するに至った。即ち、本発明は、下記構造式のいずれかで示される新規ペプチドおよびその塩、及びこれらの少なくとも一種を有効成分として含む降圧剤である。





塩の形態の場合、その塩類としては、塩酸塩、臭化水素酸塩、ヨウ化水素酸塩、硫酸塩、リン酸塩等の無機酸塩および酢酸塩、トリフルオロ酢酸塩、クエン酸塩、マレイン酸塩、フマル酸塩、酒石酸塩、乳酸塩、メタンスルホン酸塩、P-トルエンスルホン酸塩等の有機酸塩が挙げられる。なお、降圧剤に含有する場合は、医薬上許容される塩の形態をとる。

ペプチドを構成するアミノ酸は、天然に存在するという点でL-体が望ましい。

本発明のペプチドはペプチド合成に通常用いられる固相法で、ペプチド結合の任意の位置で二分される2種のフラグメントの一方に相当する反応性カルボキシル基を有する原料と、他方のフラグメントに相当する反応性アミノ基を有する原料をジシクロヘキシルカルボジイミド法を用いて縮合させ、生成する縮合物が保護基を有する場合、その保護基を除去させることにより製造し得る。

この反応工程において反応に関与すべきでない官能基は、保護基により保護される。アミノ基の保護基としては、例えばベンジルオキシカルボニル、t-ブチルオキシカルボニル、P-ビフェニ

ルイソプロピルオキシカルボニル、9-フルオレニルメチルオキシカルボニル等が挙げられる。C端のカルボキシル基はクロルメチル樹脂、オキシメチル樹脂、P-アルコキシベンジルアルコール樹脂等の担体に結合している。

縮合反応は、ジシクロヘキシルカルボジイミド等の縮合剤の存在下にて実施する。

縮合反応終了後、保護基は除去され、さらにペプチドのC端と樹脂との結合を切断する。

さらに、本発明の新規ペプチドは通常の方法に従い精製される。例えばイオン交換クロマトグラフィー、逆相液体クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー等が挙げられる。

本発明の降圧剤の有効成分として使用するペプチドまたはその塩の投与経路としては、経口投与、非経口投与、直腸内投与のいずれでもよいが、経口投与が好ましい。本発明のペプチドまたはその塩の投与量は、化合物の種類、投与方法、患者の症状・年齢等により異なるが、通常1回0.001～1000mg、好ましくは0.01～10mgを1日

当り1～3回である。本発明のペプチドまたはその塩は通常、製剤用担体と混合して調製した製剤の形で投与してもよい。製剤用担体としては、製剤分野において常用され、かつ本発明のペプチドまたはその塩と反応しない物質が用いられる。具体的には、例えば乳糖、ブドウ糖、マンニト、デキストリン、シクロデキストリン、デンプン、蔗糖、メタケイ酸アルミン酸マグネシウム、合成ケイ酸アルミニウム、結晶セルロース、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ヒドロキシプロピルデンプン、カルボキシメチルセルロースカルシウム、イオン交換樹脂、メチルセルロース、ゼラチン、アラビアゴム、ヒドロキシプロピルセルロース、低置換度ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ポリビニルピロリドン、ポリビニルアルコール、軽質無水ケイ酸、ステアリン酸マグネシウム、タルク、トラガント、ベントナイト、ビーガム、カルボキシビニルポリマー、酸化チタン、ソルビタン脂肪酸エステル、ラウリル硫酸ナトリウム、グリセリン、

脂肪酸グリセリンエステル、精製ラノリン、グリセロセラテン、ポリソルベート、マクロゴール、植物油、ロウ、流動パラフィン、白色ワセリン、フルオロカーボン、非イオン界面活性剤、プロピレングリコール、水等が挙げられる。剤型としては、錠剤、カプセル剤、顆粒剤、散剤、シロップ剤、懸濁剤、坐剤、経膏、クリーム剤、ゲル剤、貼付剤、吸入剤、注射剤等が挙げられる。これらの製剤は常法に従って調製される。なお液体製剤にあっては、用時、水又は他の適当な媒体に溶解又は懸濁する形であってもよい。また錠剤、顆粒剤は周知の方法でコーティングしてもよい。注射剤の場合には、本発明のペプチドまたはその塩を水に溶解させて調製されるが、必要に応じて生理食塩水あるいはブドウ糖溶液に溶解させてもよく、また緩衝剤や保存剤を添加してもよい。

これらの製剤は、本発明のペプチドまたはその塩を0.2%以上、好ましくは0.5~7.0%の割合で含有することができる。これらの製剤はまた、治療上価値ある他の成分を含有していてもよい。

Trp トリプトファン

Tyr チロシン

Val バリン

Pyr ピログルタミン酸

Boc t-ブチルオキシカルボニル基

Fmoc 9-フルオレニルメチルオキシカルボニル基

HOBt 1-ヒドロキシベンゾトリアゾール

DMF N,N-ジメチルホルムアミド

Bu t-ブチル基

EDTA エチレンジアミン四酢酸

TLC 薄層クロマトグラフィー

実施例 1

Leu-His-Leu-Pro-Leu-Pro

Fmoc-Pro 樹脂 (Fmoc-Pro OH が 0.53 ミリモル/樹脂の割合で導入されている p-アルコキシベンジルアルコール樹脂) 150 mg を振とうできるように装填した Merrifield の固相法用反応装置にとり、DMF (10 ml) に懸濁し 30 分間振とうし、Fmoc-Pro 樹脂を膨潤させた。

これを、以下の Fmoc 基除去サイクルに付した。

実施例

以下、実施例により本発明を具体的に説明する。

なお、本明細書中で用いた略号は、次の意味を有する。

Ala アラニン (以下アミノ酸は全て L 体)。

Arg アルギニン

Asn アスパラギン

Asp アスパラギン酸

Gln グルタミン

Glu グルタミン酸

Gly グリシン

His ヒスチジン

Ile イソロイシン

Leu ロイシン

Lys リジン

Met メチオニン

Pho フェニルアラニン

Pro プロリン

Ser セリン

Thr スレオニン

a) DMF 10 ml 中、1 分間振とう (1 回)。

b) 50% ピペリジン - DMF 溶液 10 ml 中、3 分間振とう。

c) 50% ピペリジン - DMF 溶液 10 ml 中で 10 分間振とうし、Fmoc 基を脱離する。

d) DMF 10 ml で 4 回洗浄。

e) イソプロパノール 10 ml で 1 回洗浄。

ここで、Kaiser 法 [E. Kaiser et al., Anal. Biochem. 34, 595 (1970)] により、Fmoc 基が完全に除去したことを確認し、もし、不完全ならば上記の除去サイクルを繰り返した。また、完全に除去されているならば、以下に示す縮合サイクルに供した。

f) Fmoc 基除去サイクルで得られた H-Pro 樹脂を DMF 20 ml で 2 回振とうすることによって膨潤させた。

g) Fmoc-Leu-OH (84 mg、0.24 ミリモル)、HOBt (39 mg、0.29 ミリモル) の CH_2Cl_2 : DMF = 9:1 溶液 (10 ml) を加え、1 分間振とうする。

h) 1 M ジンクロヘキシルカルボジイミド塩化メチレン溶液 0.264 ml を添加し、70 分間振とうとする。

1) DMF 10 ml で2回洗浄。

1) イソプロパノール 10 ml で2回洗浄。

ここで、Kaiser 法によって結合が完了しているか否かを確認し、もし、不完全ならば、上記の結合サイクルを繰り返した。

Fmoc-Pro-樹脂を用いている場合は、ここでの Fmoc 基除去サイクルとして以下の方法を用いた。

k) DMF 10 ml 中、1 分間振とう (1 回)。

1) 0.2 M ピペリジン-DMF 溶液 10 ml 中で 10 分間振とうを4回くり返えし、Fmoc 基を脱離する。

m) DMF 10 ml で2回洗浄。

n) イソプロパノール 10 ml で1回洗浄。

ここで、Kaiser 法によって Fmoc 基が除去されていることを確認した。そして g) スラップを Fmoc-Pro-OH で行なり結合サイクルに付した。以後同様に、Fmoc 基除去サイクルと Fmoc アミノ酸結合サイクルを繰り返して Fmoc-Leu OH、Fmoc His

(Fmoc)OH、Boc-Leu-OH 結合する。こうして

Boc-Leu-His-Leu-Pro-Leu-Pro 樹脂を得、ついで、樹脂からの脱離工程に供した。

すなわち、塩化メチレン 10 ml で2回洗浄し、塩化メチレン (5 ml) - アセトール (1.0 ml) - ナオフェノール (0.33 ml) 混合溶液に懸濁、洗いで、トリフルオロ酢酸 (10 ml) - 塩化メチレン (1.16 ml) を加え、1 時間振とうした。樹脂をろ過し、得られたろ液を減圧濃縮して、残渣にエーテルを加え、ろ過することによって、得られる白色粉末を逆相液体クロマトグラフィーに供し、求める Leu-His-Leu-Pro-Leu-Pro 画分を分取し、得られる溶出画分を濃縮乾固する。ついで、蒸留水を加え数回濃縮乾固を繰り返した後、少量の蒸留水にとかし、凍結乾燥する。こうして精製された Leu-His-Leu-Pro-Leu-Pro を得た。精製物の一部をとり FAB 質量分析器により分子量測定を行って $m/e : 689 (M^+ + H)$ となり理論値に一致した。さらに、6N-HCl 水溶液で加水分解し、アミノ酸分析に供したところ Pro, 1.98、Leu, 3.00、His,

0.97 の比となりこれもまた理論値と一致した。従って、求めるペプチドが合成されていることが確認された。

純度は、薄層クロマトグラフィーと逆相液体クロマトグラフィーで純度よく合成されていることを確認した。

実施例 2 ~ 28

上記実施例と同様の方法により下記化合物をそれぞれ合成した。

| 実施例 No. | 化 合 物 | 収 率 (%) | TLC ^{a)} R _f | MS (FAB- m/e) | アミノ酸分析 ^{b)} (実測値, () 内は計算値) |
|------------|---|------------|-------------------------------------|---------------------|--|
| 2 | Asp-Lys-Ile-Tyr-Pro-Ser-Phe-Gln-Pro- Gln-Pro-Leu-Ile-Tyr-Pro | 43.5 | 0.62 | 1807 | Asp. 1.02(1) Ser. 0.93(1) Gln. 1.97(2) Pro. 3.93(4) Ile. 1.76(2) Leu. 1.00(1) Tyr. 1.72(2) Phe. 0.99(1) Lys. 0.97(1) |
| 3 | Lys-Ile-Tyr-Pro-Ser-Phe-Gln- Pro-Gln-Pro-Leu-Ile-Tyr-Pro | 53.1 | 0.74 | 1692 | Ser. 0.93(1) Gln. 1.99(2) Pro. 3.99(4) Ile. 1.71(2) Leu. 1.01(1) Tyr. 1.72(2) Phe. 1.00(1) Lys. 0.96(1) |
| 4 | Ile-Tyr-Pro-Ser-Phe-Gln-Pro- Gln-Pro-Leu-Ile-Tyr-Pro | 27.5 | 0.80 | 1563 | Ser. 0.91(1) Gln. 1.99(2) Pro. 4.00(4) Ile. 1.84(2) Leu. 1.01(1) Tyr. 1.76(2) Phe. 1.00(1) |
| 5 | Tyr-Pro-Ser-Phe-Gln-Pro-Gln- Pro-Leu-Ile-Tyr-Pro | 53.6 | 0.70 | 1449 | Ser. 0.91(1) Gln. 1.98(2) Pro. 4.06(4) Ile. 0.96(1) Leu. 1.02(1) Tyr. 1.89(2) Phe. 1.01(1) |
| 6 | Pro-Ser-Phe-Gln-Pro-Gln-Pro- Leu-Ile-Tyr-Pro | 39.4 | 0.58 | 1286 | Ser. 0.92(1) Gln. 1.98(2) Pro. 4.03(4) Ile. 0.96(1) Leu. 1.01(1) Tyr. 0.90(1) Phe. 1.00(1) |
| 7 | Phe-Val-Gln-Pro-Ile-Pro | 49.2 | 0.81 | 701 | Gln. 1.00(1) Pro. 2.02(2) Val. 0.98(1) Ile. 1.01(1) Phe. 0.97(1) |
| 8 | Leu-Pro-Gln-Asn-Ile-Leu-Pro | 43.8 | 0.61 | 794 | Asp. 1.03(1) Gln. 1.00(1) Pro. 2.03(2) Ile. 0.93(1) Leu. 1.96(2) |
| 9 | Pro-Ala-Val-Val-Leu-Pro | 61.6 | 0.52 | 595 | Pro. 2.04(2) Ala. 0.98(1) Val. 1.77(2) Leu. 1.02(1) ^{a)} |
| 10 | Pro-Phe-Phe-Asp-Pro-Gln-Ile-Pro | 68.0 | 0.47 | 960 | Asp. 1.01(1) Gln. 0.99(1) Pro. 2.97(3) Ile. 0.99(1) Phe. 1.96(2) |
| 11 | Leu-Thr-Asp-Leu-Gln-Asn-Leu- His-Leu-Pro | 34.8 | 0.51 | 1165 | Pro. 1.96(2) Thr. 0.99(1) Gln. 1.00(1) Pro. 0.99(1) Leu. 4.04(4) His. 0.98(1) |
| 12 | Leu-His-Leu-Pro | 95.6 | 0.57 | 479 | Pro. 0.90(1) Leu. 2.00(2) His. 0.92(1) |
| 13 | Leu-Gln-Asn-Leu-His-Leu-Pro- Leu-Pro | 44.8 | 0.57 | 1046 | Asp. 0.99(1) Gln. 0.98(1) Pro. 1.97(2) Leu. 4.03(4) His. 0.91(1) |
| 14 | Gln-Asn-Leu-His-Leu-Pro-Leu-Pro | 53.1 | 0.45 | 933 | Asp. 1.00(1) Gln. 0.98(1) Pro. 1.95(2) Leu. 3.02(3) His. 0.92(1) |
| 15 | Asn-Leu-His-Leu-Pro-Leu-Pro | 53.3 | 0.56 | 803 | Asp. 1.00(1) Pro. 1.91(2) Leu. 3.01(3) His. 0.91(1) |

| | | | | | |
|----|---|------|--------------------|------|---|
| 16 | His-Leu-Pro-Leu-Pro | 52.7 | 0.59 | 576 | Pro. 1.85(2) Leu. 2.00(2) His. 0.92(1) |
| 17 | Leu-Pro-Leu-Pro | 36.7 | 0.66 | 439 | Pro. 1.86(2) Leu. 2.00(2) |
| 18 | Pro-Leu-Pro | 45.3 | 0.51 | 326 | Pro. 1.94(2) Leu. 1.00(1) |
| 19 | Pro-Gln-Thr-Leu-Ala-Leu-Pro | 46.5 | 0.56 | 739 | Thr. 0.97(1) Gln. 1.00(1) Pro. 2.03(2) Ala. 0.97(1) Leu. 2.03(2) |
| 20 | Pro-Leu-Trp-Ser-Val-Pro | 29.9 | 0.59 | 698 | Ser. 0.90(1) Pro. 2.00(2) Val. 0.99(1) Leu. 1.00(1) Trp. 0.95(1) ^{a)} |
| 21 | Pro-Val-Arg-Ala-Val-Pro | 44.9 | 0.29 ^{e)} | 538 | Pro. 2.06(2) Ala. 1.00(1) Val. 1.87(2) Arg. 0.91(1) |
| 22 | Pro-Val-Gln-Ala-Leu-Leu-Leu-Asn-Gln- Gln-Leu-Leu-Leu-Asn-Pro | 17.4 | — | 1675 | Asp. 2.02(2) Gln. 2.96(3) Pro. 1.95(2) Ala. 1.00(1) Val. 0.97(1) Leu. 6.02(6) |
| 23 | Leu-Asn-Pro-Pro-His-Gln-Ile- Tyr-Pro | 37.1 | 0.54 | 1079 | Asp. 1.00(1) Gln. 1.00(1) Pro. 2.93(3) Ile. 0.94(1) Leu. 1.00(1) Tyr. 0.89(1) His. 0.97(1) |
| 24 | Asn-Pro-Pro-His-Gln-Ile-Tyr- Pro | 45.8 | 0.26 ^{a)} | 965 | Asp. 1.01(1) Gln. 0.99(1) Pro. 2.96(3) Ile. 0.93(1) Tyr. 0.87(1) His. 0.96(1) |
| 25 | Pro-Pro-His-Gln-Ile-Tyr-Pro | 41.8 | 0.25 ^{e)} | 851 | Gln. 1.00(1) Pro. 2.99(3) Ile. 0.96(1) Tyr. 0.92(1) His. 0.96(1) |
| 26 | Pro-His-Gln-Ile-Tyr-Pro | 61.4 | 0.32 ^{a)} | 754 | Gln. 1.00(1) Pro. 1.96(2) Ile. 0.97(1) Tyr. 0.94(1) His. 0.98(1) |
| 27 | Pyr-Pro-Gln-Pro-Leu-Ile-Tyr-Pro | 42.3 | 0.63 | 938 | Gln. 1.98(2) Pro. 2.96(3) Ile. 0.98(1) Leu. 1.02(1) Tyr. 0.97(1) |
| 28 | Pyr-Pro-Leu-Ile-Tyr-Pro | 39.6 | 0.75 | 713 | Gln. 0.98(1) Pro. 2.06(2) Ile. 0.96(1) Leu. 1.02(1) Tyr. 0.94(1) |

a) TLC: BuOH:AcOH:Pyr:H₂O = 15:3:10:12 b) 110℃ 24時間加水分解。 c) TLC: BuOH:AcOH:H₂O = 4:1:2 d) 110℃ 72時間加水分解。 e) テオグリコール酸(4%)添加。

実施例 29 活性試験

本発明のペプチドまたはその塩は、アンジオテンシン変換酵素阻害作用を有する。以下に酵素阻害作用について説明する。

各ペプチド試料溶液 100 μ l に、225 μ l の 10 mM p-ヒドロキシベンゾイルグリシル-L-ヒスチジル-L-ロイシン、2.5 mM 4-アミノアンチピリン、3 ユニット/ml ヒプリカーゼ (0.7 M NaCl 含む 0.12 M ホウ酸緩衝液の溶液) を加え 37℃ で 3 分間保温後、70 ミリユニットのウサギ肺アンジオテンシン変換酵素を加え反応を開始した。20 分間 37℃ に保温後、750 μ l の 3 mM EDTA、0.2 ミリトロン X-100、6.8 mM 過マンガン酸ナトリウム溶液を加え反応を停止した後、引き続き 3 分間保温して発色させ、反応溶液を精製水を対照として波長 505 nm で比色定量した。

阻害率 50% の時の試料の濃度を IC₅₀ 値として、本発明のペプチドの一部についての値を表 1 に示す。

表 1

| 実施例 No. | 化 合 物 | IC ₅₀ (μ M) |
|------------|---|-----------------------------|
| 1 | Leu-His-Leu-Pro-Leu-Pro | 2.9 |
| 3 | Lys-Ile-Tyr-Pro-Ser-Phe-Gln-Pro-Gln-Pro-Leu-Ile-Tyr-Pro | 8.6 |
| 4 | Ile-Tyr-Pro-Ser-Phe-Gln-Pro-Gln-Pro-Leu-Ile-Tyr-Pro | 7.6 |
| 5 | Tyr-Pro-Ser-Phe-Gln-Pro-Gln-Pro-Leu-Ile-Tyr-Pro | 4.8 |
| 6 | Pro-Ser-Phe-Gln-Pro-Gln-Pro-Leu-Ile-Tyr-Pro | 2.7 |
| 8 | Leu-Pro-Gln-Asn-Ile-Leu-Pro | 4.6 |
| 9 | Pro-Ala-Val-Val-Leu-Pro | 4.5 |
| 13 | Leu-Glu-Asn-Leu-His-Leu-Pro-Leu-Pro | 8.6 |
| 15 | Asn-Leu-His-Leu-Pro-Leu-Pro | 5.1 |
| 16 | His-Leu-Pro-Leu-Pro | 4.1 |
| 23 | Leu-Asn-Pro-Pro-His-Gln-Ile-Tyr-Pro | 2.5 |
| 24 | Asn-Pro-Pro-His-Gln-Ile-Tyr-Pro | 3.7 |
| 25 | Pro-Pro-His-Gln-Ile-Tyr-Pro | 2.2 |
| 27 | Pyr-Pro-Gln-Pro-Leu-Ile-Tyr-Pro | 3.8 |
| 28 | Pyr-Pro-Leu-Ile-Tyr-Pro | 7.1 |

発明の効果

以上の結果から、本発明のペプチドは降圧作用を有し、優れた降圧剤の提供が期待できる。従って、本発明は、医薬産業上極めて有用である。

特許出願人 味の素株式会社
代理人 弁理士 石田 康 昌

第1頁の続き

⑤Int. Cl.⁵

//.A 61 K 37/16
37/18
C 07 K 99:00

識別記号

庁内整理番号

8615-4C
8615-4C

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☐ **BLACK BORDERS**

☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**

☐ **FADED TEXT OR DRAWING**

☒ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**

☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**

☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**

☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**

☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**

☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**

☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.